

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08143454 A**

(43) Date of publication of application: **04.06.96**

(51) Int. Cl.

A61K 31/20
A61K 31/20
A61K 31/23
C07C 57/12
// C07C 69/587

(21) Application number: **06283084**

(22) Date of filing: **17.11.94**

(71) Applicant: **KANAGAWA KAGAKU
KENKYUSHO:KK SAGAMI CHEM
RES CENTER**

(72) Inventor: **YAZAWA KAZUYOSHI
KANO MAYUMI
YAMAGUCHI KOJI
TSUJI TOMOKO**

**(54) NERVE GROWTH FACTOR PRODUCTION
ENHANCER**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a nerve growth factor production enhancer having excellent activity free from adverse effect.

CONSTITUTION: This nerve growth factor production enhancer contains eicosapentaenoic acid and/or docosahexaenoic acid, a 20-22C n-3 based highly

unsaturated fatty acid, its ester and a pharmaceutically permissible salt as an active ingredient. Since eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid show strong NGF production activity, they are useful as a preventive and a therapeutic agent for neural function disorder, especially dementia of Alzheimer and cerebral ischemic disease and as the nerve growth factor production enhancer for recovering peripheral nerve function and promoting neuranagenesis.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-143454

(43) 公開日 平成8年(1996)6月4日

| (51) Int.Cl. ⁹ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| A 6 1 K 31/20 | A E D | 9455-4C | | |
| | A A M | | | |
| 31/23 | A A P | 9455-4C | | |
| C 0 7 C 57/12 | | 9450-4H | | |
| // C 0 7 C 69/587 | | | | |

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平6-283084

(22) 出願日 平成6年(1994)11月17日

(71) 出願人 392030380

株式会社神奈川化学研究所
神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

(71) 出願人 000173762

財団法人相模中央化学研究所
神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

(72) 発明者 矢澤 一良

神奈川県相模原市鶴野森1-28-10

(72) 発明者 鹿野 真弓

東京都町田市金森1-7-15

(72) 発明者 山口 宏二

神奈川県相模原市南台1-9-2

(72) 発明者 辻 智子

神奈川県横浜市金沢区能見台6丁目12-2

(54) 【発明の名称】 神経成長因子産生増強剤

(57) 【要約】

【目的】 副作用の少ない、優れた活性を有する神経成長因子の産生増強剤の提供。

【構成】 炭素数20~22のn-3系高度不飽和脂肪酸であるイコサペンタエン酸及び／又はドコサヘキサエン酸、それらのエステル及び薬学上許容し得る塩を有効成分として含有する神経成長因子産生増強剤。

【効果】 イコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸が強いNGF産生増強活性を示すことから、中枢機能障害、特に、アルツハイマー痴呆症や脳虚血病態に対する予防及び治療薬、また、末梢神経機能回復および神経再生促進などの神経成長因子産生増強剤として利用される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸を有効成分として含有する神経成長因子産生増強剤。

【請求項 2】 炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸がイコサペンタエン酸及び／又はドコサヘキサエン酸、それらのエステル及び薬学上許容し得る塩である請求項 1 に記載の神経成長因子産生増強剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸を有効成分として含有する神経成長因子〔Nerve growth factor〕、以下 NGF と称する。〕産生増強剤に関するものであり、更に詳しくは、本発明の炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸として、イコサペンタエン酸及び／又はドコサヘキサエン酸、それらのエステル及び薬学上許容し得る塩を含むものである。

【0002】

【従来の技術】NGF は、神経組織の成長や機能維持に必要な栄養、成長因子の一つであり、末梢神経系では、知覚、交感神経の、また、中枢神経系では、大細胞性コリン作動性ニューロンの成熟、分化、生命維持に不可欠なものと考えられている。そこで、NGF レベルを上昇させることは、アルツハイマー病、血管性痴呆症などの中枢機能障害、脊髄損傷、末梢神経損傷、糖尿病性神経障害および筋萎縮性側索硬化症などの末梢機能障害の治療に有用と考えられている。

【0003】しかしながら、NGF は、分子量が 1 万 3 千（モノマー）もしくは 2 万 6 千（ダイマー）の蛋白質であり、血液脳関門を通過することが出来ないことから、生体中で NGF の産生を促進する物質を投与して、NGF の生合成を促進することにより、中枢機能障害および末梢機能障害を改善することが好ましいと考えられている。

【0004】この考えに基づいて NGF の産生を促進・増強する物質の探索が試みられ、これまでに、エビネフリン、ノルエビネフリンおよびドーパミンなどのカテコールアミン類が見い出されているが、これらの化合物はホルモン物質であることから、その投与は、生体内でのホルモンの量的バランスを崩すという弊害を伴うことが知られている。また、特開平 6-157338 号公報には炭素数 12~24 の飽和もしくは不飽和脂肪酸より誘導されるジアシル型のグリセロリン脂質が NGF の産生を促進すると開示されているが、炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸であるイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸、それらのエステル及び薬学上許容し得る塩が NGF の産生促進あるいは増強作用を有することは知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、副作用を伴うことのない、優れた NGF 産生増強剤を提供せんとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、NGF の産生を増強する薬剤について鋭意研究を進めたところ、炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸、とくにイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸が NGF の産生を増強する効果を示すことを見だし、本発明を完成した。

10

【0007】本発明において、n-3 系高度不飽和脂肪酸とは、遊離酸、そのエステル、及びその薬学上許容し得る塩を意味するものである。即ち、本発明においてイコサペンタエン酸とは、イコサペンタエン酸、イコサペンタエン酸メチルエステル、イコサペンタエン酸エチルエステル、イコサペンタエン酸プロピルエステル、イコサペンタエン酸 n-ブチルエステル等の化合物およびイコサペンタエン酸の薬学上許容し得る塩などを意味するものである。また、本発明においてドコサヘキサエン酸とは、ドコサヘキサエン酸、ドコサヘキサエン酸メチルエステル、ドコサヘキサエン酸エチルエステル、ドコサヘキサエン酸プロピルエステル、ドコサヘキサエン酸 n-ブチルエステル等の化合物およびドコサヘキサエン酸の薬学上許容し得る塩などを意味するものである。

20

【0008】本発明の炭素数 20~22 の n-3 系高度不飽和脂肪酸を有効成分として含有する神経成長因子産生増強剤は、経口または非経口のいずれの投与形態も可能である。経口投与の場合は、カプセル剤、錠剤、粉剤などの通常の方法で投与することもできる。また、非経口投与の場合には、注射剤、輸液剤などの剤形で投与される。さらに徐放剤も効果的である。

30

【0009】本発明の有効成分を製剤化するには、界面活性剤、賦形剤、着色料、保存料およびコーティング助剤などが適宜使用される。また、他の薬剤との併用も行うことができる。本発明の神経成長因子産生増強剤は、それ自体 NGF の産生を増大させると共に、既知の NGF の産生促進剤と組み合わせると、NGF 産生促進作用を増大させる。

40

【0010】以下に、実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0011】

【実施例】

実施例 1

マウス結合組織由来の繊維芽細胞樹立株 L-M 細胞を、0.5%バクトペプトン（Difco Laboratories 社製）を含む 199 培地（Flow Laboratories 社製）に細胞数が 0.8~1.0×10⁵ 個／穴になるように懸濁させ、平底 96 穴マイクロプレート（Nunc 社製）に入れ、CO₂ インキュベーター（37℃、5%CO₂-95%空気の不

50

含牛血清アルブミン (Armour Pharmaceutical社製) / リン酸緩衝溶液 $200\mu\text{l}$ で3回洗浄した後、ドコサヘキサエン酸 [DHA、 $30\mu\text{mol/L}$] を含む 0.5% 牛血清アルブミン / 199 培地 $200\mu\text{l}$ に培地交換して24時間 CO_2 インキュベーター中で培養後、各穴を 0.5% 牛血清アルブミン / リン酸緩衝溶液 $200\mu\text{l}$ で3回洗浄して脂肪酸 (ドコサヘキサエン酸) を除去し、次いで4-メチルカテコールを含む 0.5% 牛血清アルブミン / 199 培地 $200\mu\text{l}$ を各穴に加え、更に、24時間 CO_2 インキュベーター中で培養した。培養後、上澄液中に含まれるNGF量を下記の酵素免疫測定法 (KorschingとThoenen, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 3513-3516, 1983.) で測定した。結果を表1に示す。

【0012】NGFの測定法ポリスチレン製の96穴マイクロプレート (住友ベークライト社製 MS-3496F) に抗マウス β NGF抗体 (マウス顎下腺より調製した β NGFを抗原にして作製したもの) 溶液 (pH8.3) を各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C で4時間放置した。マイクロプレートに吸着されなかった抗体を除去後、洗浄液で各穴を3回洗浄した。標準試料溶液 (β NGF 東洋紡社製) あるいは試料溶液をそれぞれ $40\mu\text{l}$ ずつ各穴に分注し、 4°C で18時間放置した後、試料溶液を除去し、各穴を3回洗浄した。 β -ガラクトシダーゼ標識抗体 β NGFモノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim社製) 溶液 (40mU/ml , pH7.6) を各穴に $50\mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C で4時間放置した後、標識抗体を除去し、3回洗浄した。4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (Sigma社製) 溶液 ($20\mu\text{g/ml}$, pH7.6) を各穴に $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、室温で1.5時間反応させた後 0.2M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH10.3) を各穴に $100\mu\text{l}$ ずつ分注して酵素反応を停止させ、生成した4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度をプレートリーダーで測定し、標準曲線よりNGF量を算出した。

【0013】

【表1】

| 4-メチルカテコール の添加量 | DHA処理した細胞の NGF産生相対値 |
|--------------------|------------------------|
| 無添加 | 1.52 |
| 1.56mg/ml | 1.34 |
| 3.13mg/ml | 2.19 |
| 6.25mg/ml | 6.07 |

【0014】なお、被験化合物 (ドコサヘキサエン酸) のNGF産生増強活性は、無処理細胞 (被験化合物無添加) が産生したNGF量に対する相対値で表した。上記の結果から明かなように、DHAは単独で1.5倍のNGFを産生すると共に、既知のNGF産生剤である4

メチルカテコールと組合わせ場合、6倍以上のNGFを産生した。

【0015】実施例2

被験化合物としてイコサペンタエン酸 (EPA) を用いた以外は実施例1と同様にして、NGF産生増強活性を調べた。結果を表2に示す。

【0016】

【表2】

| 4-メチルカテコール の添加量 | EPA処理した細胞の NGF産生相対値 |
|--------------------|------------------------|
| 無添加 | 3.20 |
| 1.56mg/ml | 1.69 |
| 3.13mg/ml | 3.28 |
| 6.25mg/ml | 3.41 |

【0017】上記の結果から明かなように、EPAは、既知のNGF産生促進剤である4-メチルカテコールと組合わせ場合、3倍以上のNGFを産生した。

【0018】参考例1

被験化合物としてリノール酸を用いた以外は実施例1と同様にして、NGF産生増強活性を調べた。結果を表3に示す。

【0019】

【表3】

| 4-メチルカテコール の添加量 | リノール酸処理した細胞の NGF産生相対値 |
|--------------------|--------------------------|
| 無添加 | 1.25 |
| 1.56mg/ml | 1.24 |
| 3.13mg/ml | 1.50 |
| 6.25mg/ml | 1.69 |

【0020】参考例2

被験化合物としてリノレン酸を用いた以外は実施例1と同様にして、NGF産生増強活性を調べた。結果を表4に示す。

【0021】

【表4】

| 4-メチルカテコール の添加量 | リノレン酸処理した細胞の NGF産生相対値 |
|--------------------|--------------------------|
| 無添加 | 0.92 |
| 1.56mg/ml | 0.92 |
| 3.13mg/ml | 1.24 |
| 6.25mg/ml | 1.29 |

【0022】参考例3

被験化合物としてアラキドン酸を用いた以外は実施例1と同様にして、NGF産生増強活性を調べた。結果を表

(4)

特開平 8-143454

5

6

5 に示す。

【0023】

【表5】

| 4-メチルカテコール の添加量 | アラキドン酸処理した細胞の NGF 産生相対値 |
|--------------------|----------------------------|
|--------------------|----------------------------|

| | |
|-----------|------|
| 無添加 | 1.27 |
| 1.56mg/ml | 1.09 |
| 3.13mg/ml | 0.81 |
| 6.25mg/ml | 1.97 |

【0024】

【発明の効果】炭素数が20~22のn-3系高度不飽和脂肪酸である、イコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸が強いNGF産生増強活性を示すことから、本発明の神経成長因子産生増強剤は、中枢機能障害、特に、アルツハイマー痴呆症や脳虚血病態に対する予防及び治療薬、また、末梢神経機能回復および神経再生増強剤として利用される。

10